

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑪ DE 3604815 A1

⑳ Aktenzeichen: P 36 04 815.1
㉔ Anmeldetag: 15. 2. 88
㉕ Offenlegungstag: 20. 8. 87

⑤ Int. Cl. 4:
G 01 N 21/64
G 01 N 21/25
G 01 J 1/04
// G 01 N 33/483

DE 3604815 A1

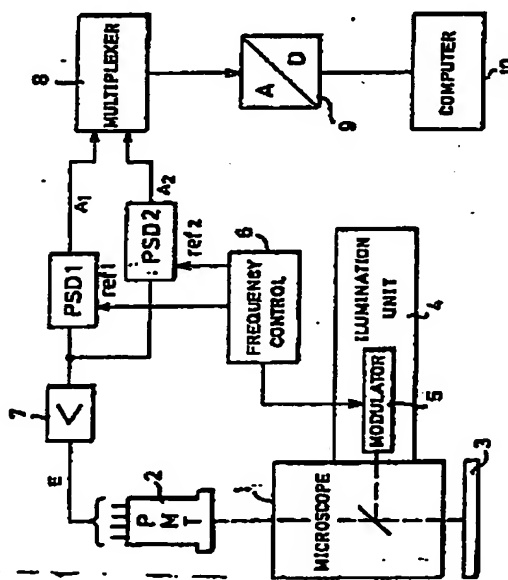
㉑ Anmelder:
Fa. Carl Zeiss, 7920 Heidenheim, DE

㉒ Erfinder:
Baurschmidt, Peter, Dr., 7080 Aalen, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑬ Mikroskopphotometer

Das Photometer besitzt ein anstelle der Leuchte (Lampengehäuse) am Mikroskop anbringbaren Beleuchtungsblock (4), der zwei auswechselbare Filter und einen beide durch die Filter hindurchtretende Teilstrahlen gleichzeitig, aber mit unterschiedlicher Frequenz modulierenden Chopper (5) enthält. Im Nachweis Kanal sind zwei auf die beiden Frequenzen des Choppers (5) abgestimmte Schmalbandverstärker PSD1 und PSD2 in Parallelschaltung angeordnet.



DE 3604815 A1

Patentansprüche

1. Mikroskopphotometer zur Messung der Fluoreszenz oder Absorption einer Probe bei zwei verschiedenen Wellenlängen, dadurch gekennzeichnet, daß

- ein anstelle der Leuchte (Lampengehäuse) am Mikroskop anbringbarer Beleuchtungsblock (4, 104) vorgesehen ist,
- der Beleuchtungsblock mindestens zwei Filter (17, 18; 117, 118) sowie eine das durch die beiden Filter hindurchtretende Licht gleichzeitig mit unterschiedlicher Frequenz modulierende Einheit (3, 105) enthält,
- und im Nachweiskanal hinter dem zur Intensitätsmessung des von der Probe ausgehenden Lichts verwendeten Empfänger (Photomultiplier 2) zwei, auf die Frequenzen der Modulationseinheit (5, 105) abgestimmte Schmalbandverstärker (PSD1, PSD2) in Parallelschaltung angeordnet sind.

2. Mikroskopphotometer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Filter (17, 18; 117, 118) auswechselbar sind.

3. Mikroskopphotometer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Modulationseinheit (5) ein mehrere Spuren (23, 24) unterschiedlicher Teilung aufweisendes Zerkhackerrad (19) ist.

4. Mikroskopphotometer nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Beleuchtungsblock zwei Abbildungsstrahlengänge enthält, die das Licht in die Ebene des Zerkhackerrades fokussieren.

5. Mikroskopphotometer nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Bündeldurchmesser der beiden Strahlengänge in der Ebene des Zerkhackerrades unterschiedlich ist.

6. Mikroskopphotometer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Modulationseinheit (105) aus zwei separat ansteuerbaren Lichtverschlüssen (119, 120) besteht.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Mikroskopphotometer zur Messung der Fluoreszenz oder Absorption einer Probe bei zwei verschiedenen Wellenlängen.

Für zellbiologische Untersuchungen werden zur Markierung der Proben zunehmend fluorochrome Substanzen eingesetzt, die eine Messung ganz spezieller Zell- bzw. Probeigenschaften erlauben. Die Wirkungsweise der Markierungen beruht darauf, daß Änderungen im spektralen Verhalten der fluorochromen Substanz unter dem Einfluß von chemisch/biologischen Reaktionen auftreten, wie das in Fig. 4 schematisch dargestellt ist.

Beispielsweise ändert die Markiersubstanz FURA-2 ihr Fluoreszenzverhalten in der in Fig. 5 skizzierten Form, wenn sie Änderungen in der Konzentration freier Ca-Ionen in der zu untersuchenden Zellprobe, ausgesetzt sind. Durch fluorometrische Messungen bei zwei Anregungswellenlängen unter einem Mikroskopphotometer läßt sich deshalb die Konzentration von freien Kalziumionen in Zellen bestimmen.

Gegenüber früher verwendeten Markierungen, die nur im absoluten Intensitätsmaß und nicht im spektralen Verhalten variieren, besitzt die neue Markierung die Vorteile einer Relativmessung. Es werden deshalb Ge-

räteigenschaften und Instabilitäten z. B. der Beleuchtung eliminiert (Quotientenverfahren).

In der Zeitschrift "Cell Calcium" 6 (1985) Seite 145—157 ist von Tsien et al. ein Mikroskopphotometer beschrieben, das zur Anregung der Probe bei zwei verschiedenen Wellenlängen zwei Lichtquellen und zwei der Lichtquelle nachgeschalteten durchstimmbare Monochromatoren besitzt. Das Licht beider Monochromatoren wird über einen Zerkhackerrad sequentiell in den Beleuchtungsstrahlengang des Mikroskops eingekoppelt. Diese bekannte Anordnung ist sehr aufwendig und teuer und läßt sich nicht ohne weiteres nachträglich an bereits vorhandene Mikroskope bzw. Mikroskopphotometer anbauen.

Es ist auch vorgeschlagen worden, anstelle der Monochromatoren und des Zerkhackerrades ein rotierendes Paar von Interferenzfiltern einzusetzen. Eine derartige Beleuchtungsanordnung ist z. B. in der US-PS 34 97 690 für einen anderen Zweck beschrieben. Beide Lösungen haben aber grundsätzlich den Nachteil, daß die zu den zwei unterschiedlichen Wellenlängen gehörenden Signale vom Detektor des Photometers nacheinander erfaßt werden. Diese Art des Nachweises stellt ein reines Umschaltverfahren dar, bei dem die Signalfrequenz weitgehend erhalten bleiben muß und das deshalb eine hohe Verstärkungsbandbreite erfordert. Eine hohe Verstärkungsbandbreite macht jedoch das Meßsystem empfindlich gegenüber Störungen von Umgebungslicht und Rauschen des Detektors und der Verstärker. Die Nachweismengen dieses Verfahrens sind deshalb beschränkt.

Es ist die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein Mikroskopphotometer zu schaffen, das eine besonders empfindliche Messung bei zwei verschiedenen Wellenlängen gestattet, wobei die dafür nötige Beleuchtungseinrichtung leicht und ohne großen Aufwand nachträglich an ein bereits vorhandenes Mikroskop adaptiert werden kann.

Diese Aufgabe wird gemäß dem Kennzeichen des Hauptanspruches dadurch gelöst, daß ein anstelle der Leuchte (Lampengehäuse) am Mikroskop anbringbarer Beleuchtungsblock (4, 104) vorgesehen ist, der Beleuchtungsblock mindestens zwei Filter (17, 18; 117, 118) sowie eine das durch die beiden Filter hindurchtretende Licht gleichzeitig mit unterschiedlicher Frequenz modulierende Einheit (3, 105) enthält, und im Nachweiskanal hinter dem zur Intensitätsmessung des von der Probe ausgehenden Lichts verwendeten Empfänger (Photomultiplier 2) zwei, auf die Frequenzen der Modulationseinheit (5) abgestimmte Schmalbandverstärker (PSD1, PSD2) in Parallelschaltung angeordnet sind.

Durch diese Maßnahme werden vom Detektor des Photometers die der Anregung bei unterschiedlicher Wellenlänge entsprechenden Signale gleichzeitig erfaßt und parallel ausgewertet. Aufgrund der schmalbandigen Signalverarbeitung in den beiden parallelen Zweigen der Nachweiselektronik ergibt sich ein hohes Signal/Rauschverhältnis, so daß die Nachweismenge stark verbessert ist.

Die Beleuchtungseinrichtung läßt sich zudem als modulare Baugruppe leicht anstelle des sonst üblichen Lampengehäuses am Mikroskopphotometer anbringen. Es ist vorteilhaft, ein Zerkhackerrad mit mehreren Spuren unterschiedlicher Teilung oder separat ansteuerbare Lichtverschlüsse zur gleichzeitigen Modulation des Lichts beider Wellenlängen mit zwei verschiedenen Frequenzen vorzusehen.

Die für die Trennung des Lichts in verschiedene Wellenlängen verwendeten Filter, wie z. B. Interferenzfilter,

sind zweckmäßig auswechselbar im Beleuchtungsblock angeordnet, damit die Anregungswellenlängen an das spektrale Verhalten unterschiedlicher Markiersubstanzen angepaßt werden können.

Weitere Vorteile der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus der nachstehenden Beschreibung von Ausführungsbeispielen anhand der Fig. 1–7 der Zeichnung.

Fig. 1a ist eine schematische Schnittzeichnung eines ersten Ausführungsbeispiels für den Beleuchtungsblock des erfindungsgemäßen Photometers;

Fig. 1b ist eine vergrößerte Detailzeichnung des Zerkhackerrades (19) aus Fig. 1;

Fig. 2 ist eine schematische Schnittzeichnung eines zweiten Ausführungsbeispiels für den Beleuchtungsblock des Photometers;

Fig. 3 ist eine schematische Schnittzeichnung eines dritten Ausführungsbeispiels für den Beleuchtungsblock des Photometers;

Fig. 4 ist eine Prinzipskizze, die den spektralen Verlauf der Extinktion einer Markiersubstanz unter dem Einfluß von chemisch-biologischen Reaktionen zeigt;

Fig. 5 stellt das Anregungsspektrum der fluorochromen Markiersubstanz FURA-2 für zwei verschiedene Ca^{2+} -Konzentrationen dar;

Fig. 6 ist eine Prinzipskizze des gesamten Photometeraufbaus einschließlich des Nachweiskanalans;

Fig. 7 ist ein Diagramm des zeitlichen Signalverlaufs am Ausgang des Detektors (2) aus Fig. 6.

Das in Fig. 6 in seinem Gesamtaufbau skizzierte Photometer besteht aus einem Mikroskop (1) herkömmlicher Bauart, das einen Photomultiplier (2) als Detektor für den Nachweis der von der Probe (3) ausgehenden z. B. Fluoreszenzstrahlung besitzt. Zur Anregung der Probe (3) mit Licht zweier verschiedener Wellenlängen dient ein Beleuchtungsblock (4), der eine Modulationseinheit (5) enthält. Der Beleuchtungsblock (4) wird noch im Zusammenhang mit den Fig. 1–3 näher beschrieben.

Der Modulator (5) wird von einem Steuergerät (6) angesteuert und moduliert die Intensität der beiden Teilbündel des Beleuchtungslichtes mit zwei unterschiedlichen Frequenzen f_1 und f_2 . Beide Frequenzen werden außerdem über die mit ref_1 und ref_2 bezeichneten Leitungen als Referenzfrequenz zwei parallel geschalteten Schmalbandverstärkern PSD1 und PSD2 zugeführt, deren Eingänge mit dem Ausgang eines dem Photomultiplier (2) nachgeschalteten Vorverstärkers (7) verbunden sind.

Die Schmalbandverstärker PSD1 und PSD2 enthalten phaseneempfindliche Gleichrichter, die auf der jeweiligen Referenzfrequenz ref_1 und ref_2 arbeiten (lock-in-Technik). Dabei entstehen aus dem vom Photomultiplier (2) gelieferte Signal E , dessen zeitlichen Verlauf Fig. 7 zeigt, zwei Einzelsignale A 1 und A 2 an den Ausgängen der Schmalbandverstärker PSD1 und PSD2, die der Intensität der Fluoreszenzstrahlung der Probe (3) bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen entsprechen. Die Signale A 1 und A 2 werden von einem Multiplexer (8) abgefragt und nach Wandlung im Analog/Digitalwandler (9) einem Computer (10) zur Berechnung z. B. der Konzentration der in der Probe (3) enthaltenen Ca^{2+} -Ionen zugeführt. Eine Synchronisierung zwischen der Steuereinheit (6) des Modulators (5) und der Arbeitsfrequenz des Multiplexers (8) bzw. des Rechners (10) ist bei dieser Anordnung nicht erforderlich.

In Fig. 1a ist der verwendete Beleuchtungsblock (4) detaillierter dargestellt. Er besteht aus einem geschlossenen Gehäuse (26), das anstelle der sonst dort befestig-

ten Mikroskopleuchte mit Hilfe der üblichen Aufnahmeschwalbe (11) an dem Stativ (25) des Mikroskopphotometers befestigt ist. Im Innern des Gehäuses (26) befindet sich eine Hochleistungslichtquelle (12) wie z. B. eine Quecksilberhochdrucklampe mit zwei einander diametral gegenüberstehenden Lampenkollektoren (13 und 14). Die beiden von der Lampe (12) ausgehenden Lichtbündel werden von Umlenkspiegeln (15 und 16) je einem Anregungsfilter (17 und 18) mit unterschiedlicher spektraler Transmission zugeführt. Bei den Filtern (17 und 18) handelt es sich z. B. um Interferenzfilter, deren Durchlaßbereich in der Nähe der beiden in Fig. 5 mit λ_1 und λ_2 bezeichneten Wellenlängen bei etwa 340nm und 380nm liegt.

Die beiden durch die Filter (17 und 18) hindurchtretenden Teilstrahlen unterschiedlicher Wellenlänge werden von einem Zerkhackerrad (19), das von einem Motor (20) angetrieben wird, periodisch aber mit unterschiedlicher Frequenz moduliert.

Fig. 1b zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Zerkhackerrades. Darauf sind die beiden Spuren (23 und 24) mit unterschiedlicher Teilung deutlich zu erkennen. Nach Modulation durch das Zerkhackerrad (19) werden beide Teilstrahlen über einen Strahlteiler (21) gemeinsam in den Beleuchtungsstrahlengang des Mikroskopphotometers eingespiegelt.

Bei rechteckförmiger Modulation des Anregungslichtes entstehen Oberwellensignale, die den Nachweis der Signale auf den Grundfrequenzen f_1 und f_2 durch die Schmalbandverstärker PSD1 und PSD2 stören können. Es ist möglich diese Störungen zu verringern, indem man das Verhältnis der Teilungen beider Spuren (23 und 29) des Zerkhackerrades und damit das Verhältnis der Frequenzen f_1 und f_2 ungeradzahlig wählt. Durch diese Maßnahme wird verhindert, daß Oberwellen z. B. der Frequenz f_1 den Nachweis auf der Frequenz f_2 beeinflussen. Geht man außerdem dazu über, die Intensität des Anregungslichts zumindest annähernd sinusförmig zu modulieren, werden Oberwellen von vornherein unterdrückt. Eine sinusförmige Modulation erreicht man durch geeignete Anpassung des Bündelquerschnitts des Beleuchtungsstrahlenganges in der Ebene des Zerkhackerrades an die Abmessungen der Öffnungen des Zerkhackerrades.

Dazu enthält der Beleuchtungsblock im Ausführungsbeispiel nach Fig. 2 zwei Kollektoren (33 und 34) unterschiedlicher Brennweite, die das Licht der Lampe (32) jeweils so in die Ebene des Zerkhackerrades (29) fokussieren, daß zwei kreisförmige Felder unterschiedlichen Durchmessers entsprechend der Größe der Öffnungen auf beiden Spuren des Zerkhackerrades entstehen. Die beiden Linsen (35 und 36) in Lichtrichtung hinter dem Zerkhackerrad (29) dienen dazu, die beiden unterschiedlichen Teilstrahlengänge im Beleuchtungsblock wieder einander anzupassen. Die übrigen Bauteile entsprechen denen im Ausführungsbeispiel nach Fig. 1, so daß auf eine Wiederholung an dieser Stelle verzichtet werden kann.

In Fig. 3 ist ein alternatives Ausführungsbeispiel für den Beleuchtungsblock aus Fig. 1/2 dargestellt. Der Beleuchtungsblock (104) in Fig. 3 enthält in seinem Gehäuse (124) anstelle des von einem Motor angetriebenen Zerkhackerrades eine Modulationseinheit (105) gebildet aus zwei einzeln ansteuerbaren, elektro-optischen Lichtverschlüssen (119 und 120). Die Lichtverschlüsse modulieren die beiden durch die Filter (117 und 118) hindurchtretenden Teilstrahlen unabhängig voneinander. Um eine möglichst hohe Modulationsfrequenz err-

reichen zu können sind z. B. Kerrzellen für die Lichtverschlüsse verwendet.

Diese Lösung mit zwei Lichtverschlüssen bietet den Vorteil, daß die Öffnungszeiten bzw. die Modulationsfrequenzen frei wählbar und für beide Beleuchtungsstrahlengänge unabhängig voneinander einstellbar sind. Sie können dann im Hinblick auf das Signal/Rauschverhältnis im Nachweiskanal optimiert werden.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

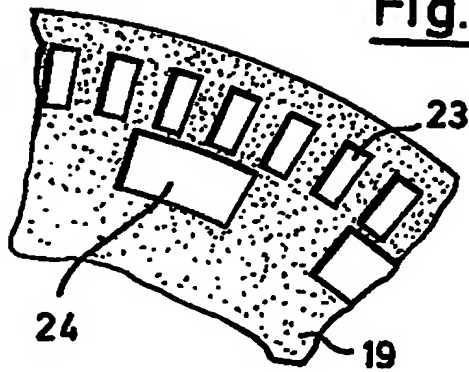
55

60

65

38 04 815
G 01 N 21/64
15. Februar 1988
20. August 1987

Fig.1a



3604815

Fig.2

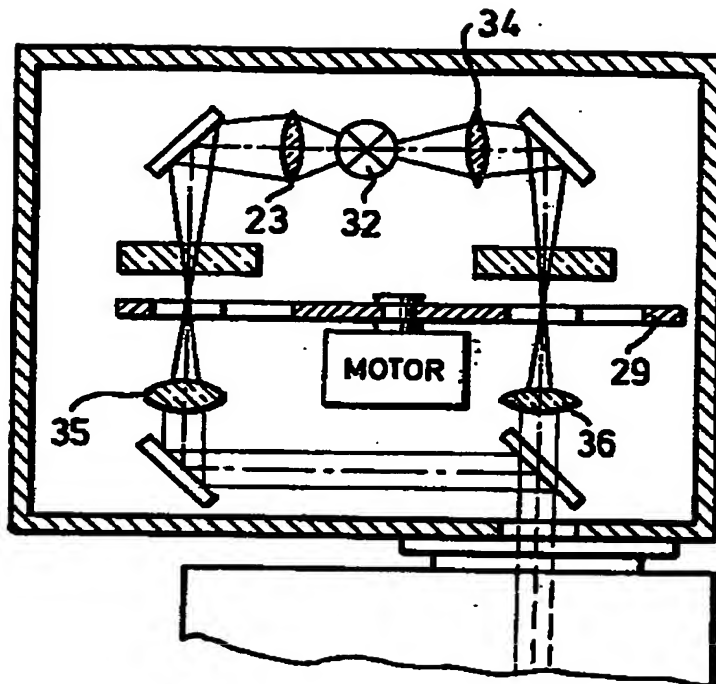
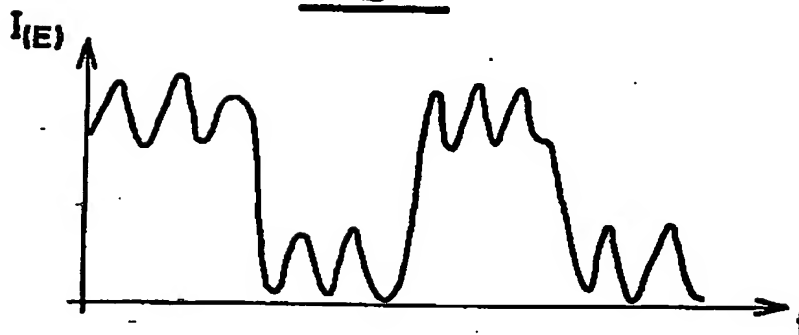


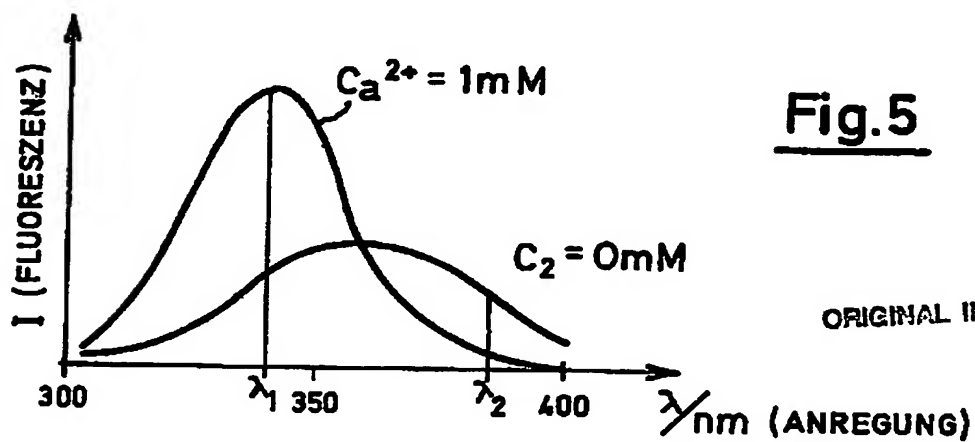
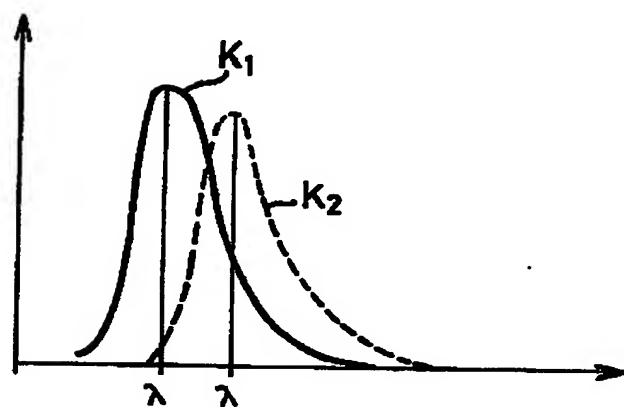
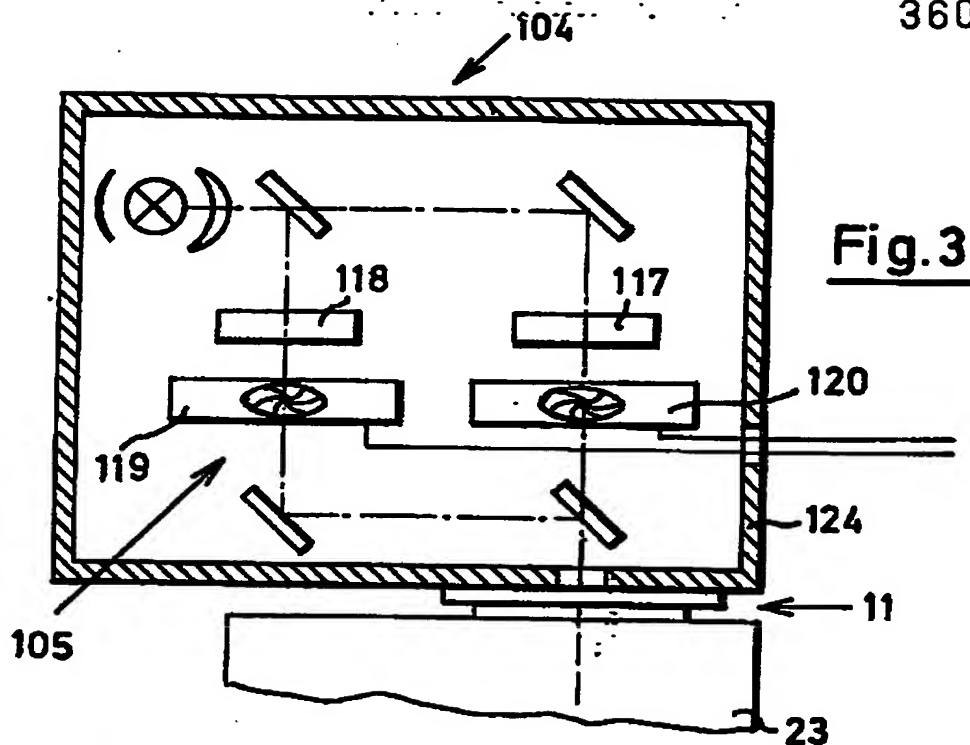
Fig.7



ORIGINAL INSPECTED ..

86005P

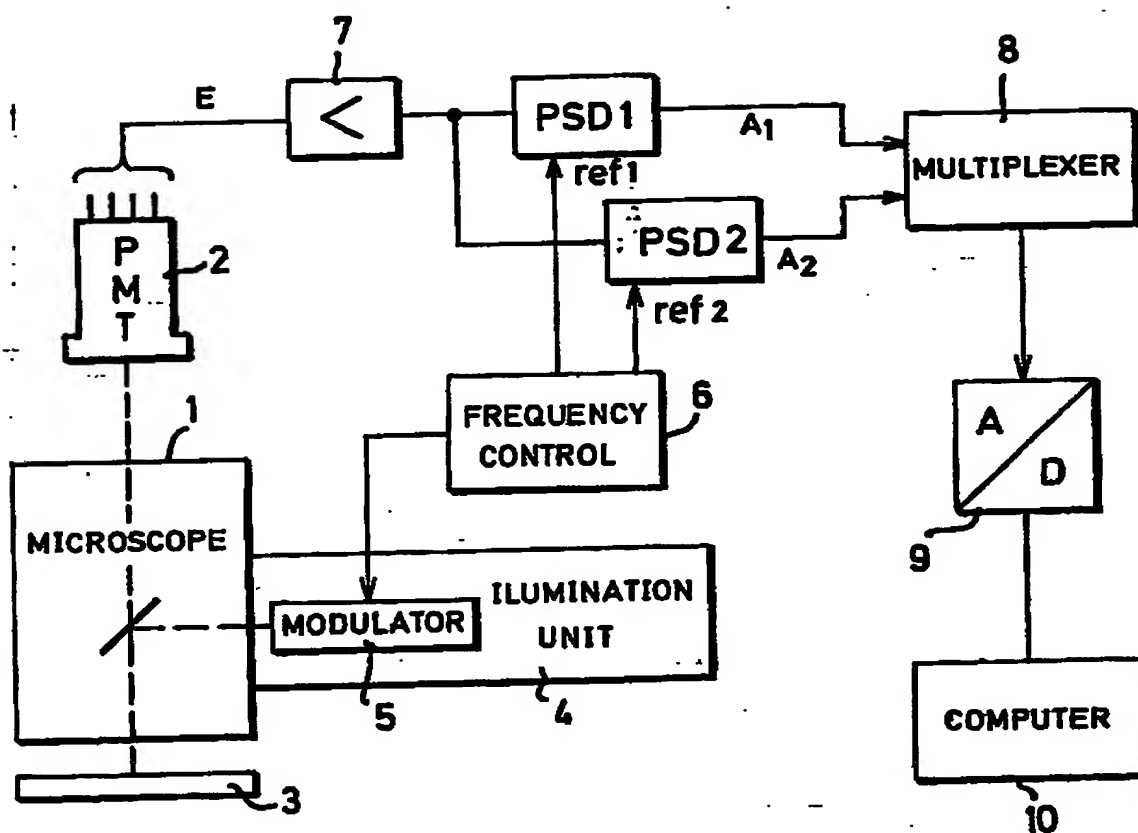
3604815



ORIGINAL INSPECTED

3604815

Fig.6



ORIGINAL INSPECTED

86 005 f

28150P US-WO / JOsl
Olympus BioSystems GmbH
National Phase of PCT/EP03/07513

Abstract and Claims of DE 36 04 815 A1
(Translation)

Abstract:

Microscope Photometer

The photometer has an illumination unit (4) attachable to the microscope in lieu of the light (lamp casing) which contains two replaceable filters and a chopper (5) that simultaneously, but with different frequencies, modulates both partial beams passing through the filter. Two narrow-band amplifiers PSD1 and PSD2 tuned to the two frequencies of the chopper (5) are arranged in parallel connection in the detection channel.

Patent Claims:

1. Microscope photometer for measuring fluorescence or absorption of a sample at two different wavelengths, **characterized in that**
 - there is provided an illumination unit (4, 104) in lieu of the light (lamp casing) attachable to the microscope,
 - said illumination unit contains at least two filters (17, 18; 117, 118) and a unit (5, 105) simultaneously modulating the light passing through the two filters with different frequencies,
 - and that two narrow-band amplifiers (PSD1, PSD2) tuned to the frequencies of the modulation unit (5, 105) are arranged in parallel connection in the detection channel behind the receiver (photo multiplier 2) for measuring the intensity of the light coming from the sample.

2. Microscope photometer according to claim 1, characterized in that the filters (17, 18; 117, 118) are replaceable.
3. Microscope photometer according to claim 1, characterized in that the modulation unit (5) is a chopper wheel (19) that has several tracks (23, 24) with various spacings.
4. Microscope photometer according to claim 3, characterized in that said illumination unit contains two projection beam paths focussing the light onto the level of the chopper wheel.
5. Microscope photometer according to claim 4, characterized in that the two beam paths in the level of the chopper wheel have different beam diameters.
6. Microscope photometer according to claim 1, characterized in that the modulation unit (105) consists of two separately controlable light obstructors (119, 120).

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.